

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><b>C12Q 1/68 // C07H 21/00, C07K 7/00</b>  |  | A1   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/27680</b> |
|   |  | (43) Internationales<br>Veröffentlichungsdatum:  | 12. September 1996 (12.09.96)                                   |
| (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP96/00893</b>  |  | (74) Anwälte: KNAUER, Martin usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).   |   |
| (22) Internationales Anmeldedatum: <b>4. März 1996 (04.03.96)</b>   |  | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |   |
| (30) Prioritätsdaten:<br>95103122.8 <b>4. März 1995 (04.03.95)</b> EP<br>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: <b>AT usw.</b><br>95118843.2 <b>30. November 1995 (30.11.95)</b> EP<br>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: <b>AT usw.</b><br>19548590.4 <b>23. December 1995 (23.12.95)</b> DE |  | Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  |   |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):<br><b>BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</b>   |  |  |   |
| (72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Unterholzstrasse 22, D-82377 Penzberg (DE). ØRUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Vorlose (DK). LESTER, Ane-Ullerup [DK/DK]; Skyttedal 20, DK-2850 Narum (DK). GEIGER, Albert [DE/DE]; Birkenstrasse 25, D-82377 Penzberg (DE).</b>   |  |  |   |
| (54) Title: <b>SEQUENCE-SPECIFIC DETECTION OF NUCLEIC ACIDS</b>   |  |  |   |
| (54) Bezeichnung: <b>SEQUENZSPEZIFISCHER NACHWEIS VON NUKLEINSÄUREN</b>   |  |  |   |
| (57) Abstract<br><p>The invention concerns a method of detecting point mutations and polymorphisms in nucleic acids and of sequencing unknown nucleic acids by means of a simple method using arrays. According to the method, nucleic acid analogues are used as sequence discriminators. This method facilitates the operating method, even in complex cases.</p>                                 |  |  |   |
| (57) Zusammenfassung<br><p>Ein Verfahren zum Nachweis von Punktmutationen und Polymorphismen in Nukleinsäuren bzw. zur Sequenzierung unbekannter Nukleinsäuren durch ein einfaches Verfahren unter Verwendung von Arrays benutzt Nukleinsäureanaloge als Sequenz-Diskriminatoren. Dieses Verfahren erleichtert die Arbeitsweise auch in komplexen Problemfällen.</p>                                |  |  |   |

BEST AVAILABLE COPY

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien                       | GB | Vereinigtes Königreich            | MX | Mexiko                         |
| AT | Österreich                     | GE | Georgien                          | NE | Niger                          |
| AU | Australien                     | GN | Guinea                            | NL | Niederlande                    |
| BB | Barbados                       | GR | Griechenland                      | NO | Norwegen                       |
| BE | Belgien                        | HU | Ungarn                            | NZ | Neuseeland                     |
| BF | Burkina Faso                   | IE | Irland                            | PL | Polen                          |
| BG | Bulgarien                      | IT | Italien                           | PT | Portugal                       |
| BJ | Benin                          | JP | Japan                             | RO | Rumänien                       |
| BR | Brasilien                      | KE | Kenya                             | RU | Russische Föderation           |
| BY | Belarus                        | KG | Kirgisistan                       | SD | Sudan                          |
| CA | Kanada                         | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden                       |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea                    | SG | Singapur                       |
| CG | Kongo                          | KZ | Kasachstan                        | SI | Slowenien                      |
| CH | Schweiz                        | LI | Liechtenstein                     | SK | Slowakei                       |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LK | Sri Lanka                         | SN | Senegal                        |
| CM | Kamerun                        | LR | Liberia                           | SZ | Swasiland                      |
| CN | China                          | LU | Litauen                           | TD | Tschad                         |
| CS | Tschechoslowakei               | LV | Lettland                          | TG | Togo                           |
| CZ | Tschechische Republik          | MC | Monaco                            | TJ | Tadschikistan                  |
| DE | Deutschland                    | MD | Republik Moldau                   | TT | Trinidad und Tobago            |
| DK | Dänemark                       | MG | Madagaskar                        | UA | Ukraine                        |
| EE | Estland                        | ML | Mali                              | UG | Uganda                         |
| ES | Spanien                        | MN | Mongolei                          | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland                       | MR | Mauretanien                       | UZ | Usbekistan                     |
| FR | Frankreich                     | MW | Malawi                            | VN | Vietnam                        |
| GA | Gabon                          |    |                                   |    |                                |

## **Sequenzspezifischer Nachweis von Nukleinsäuren**

Gegenstand der Erfindung ist ein fester Träger, an dessen Oberfläche an vorbestimmten Stellen zwei oder mehr Nukleinsäureanaloge unterschiedlicher Basensequenz gebunden sind, und Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren unter Verwendung eines solchen Trägers.

Die Analytik von Proben hat in den letzten Jahrzehnten eine schnelle Entwicklung durchgemacht. Während in den Anfangsjahren Analyten insbesondere durch ihre Reaktion mit konventionellen chemischen Reagenzien und später mit Enzymen nachgewiesen wurden, haben sich Tests, die immunologische Eigenschaften des Analyten benutzen, in jüngerer Zeit besonders bei der medizinischen Diagnostik als Standard durchgesetzt. Dies gilt insbesondere auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten. Mit immunologischen Verfahren sind jedoch im wesentlichen nur solche Analyte nachzuweisen, bei denen immunologisch aktive Verbindungen, wie Antigene oder Antikörper, eine Rolle spielen. Bei vielen Infektionen durch Viren und Bakterien haben sich daher aussichtsreiche Anwendungsmöglichkeiten ergeben. Durch immunologische Verfahren sind genetische Erkrankungen oder Prädispositionen, die sich nicht oder nicht ausreichend in einer Änderung von Proteinmustern auswirken, jedoch nur schwer oder gar nicht nachweisbar. In vielen Fällen wurden daher in jüngster Zeit Nukleinsäuren zum Gegenstand des Nachweises gemacht. Aus der Anwesenheit bestimmter Nukleinsäuren läßt sich dann auf die Anwesenheit eines infektiösen Agens oder den genetischen Zustand eines Organismus zurückschließen. Nachweise, die auf der Anwesenheit spezieller Nukleotidsequenzen beruhen, wurden insbesondere dadurch erleichtert, daß mittlerweile Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, die nur in geringer Anzahl vorliegen, zur Verfügung stehen. Der spezifische Nachweis von Nukleotidsequenzen stellt jedoch wegen der großen Menge an Sequenzinformation und der oft nur in einer einzigen Baseneinheit unterschiedlichen Sequenz zweier in ihrer Funktion völlig unterschiedlicher Nukleotidsequenzen immer noch eine große Herausforderung an Reagenzien und Arten der Durchführung von Analysen, die auf dem Nachweis von Nuklein-

säuresequenzen beruhen. Oftmals sind auch die nachzuweisenden Nukleotidsequenzen als solche nicht bekannt, sondern sollen durch den Nukleinsäurenachweis erst ermittelt werden.

In EP-B-0-237 362 ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleotidsequenzen des HLA-Gens beschrieben, mit dem eine klinisch relevante Punktmutation ausfindig gemacht werden kann. Bei diesem Verfahren wird ein Oligonukleotid, welches an eine Membran gebunden ist und das eine Nukleotidsequenz aufweist, die exakt komplementär zu einer der beiden zu unterscheidenden Nukleinsäuren ist, mit der Probe in Kontakt gebracht. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen bindet nur die exakt komplementäre Nukleinsäure an das festphasengebundene Oligonukleotid und kann nachgewiesen werden.

In Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6230-6234 (1989) ist ein Verfahren beschrieben, bei dem eine Vielzahl von Oligonukleotiden, die über Poly-dT an vorbestimmten unterschiedlichen Stellen einer Nylonmembran gebunden sind, zum simultanen Nachweis aller bekannten allelischen Varianten eines amplifizierten Bereiches einer Nukleinsäure verwendet werden.

In US-A 5,202,231 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem theoretisch die Sequenz einer Nukleinsäure dadurch bestimmt werden kann, daß Oligonukleotide mit einer vorbestimmten und bekannten Sequenz mit der Probe der unbekannten Nukleinsäure unter Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht wird. Alle möglichen Permutationen der Nukleotidsequenz müssen hierzu an bekannten Orten einer Festphase immobilisiert sein. Durch Feststellen, an welchen Orten die Nukleinsäure mit zu bestimmender Sequenz hybridisiert, kann theoretisch festgestellt werden, welche Sequenzen in der Nukleinsäure vorhanden sind.

In Nucleic Acids Research 22, 5456-5465 (1994) und Clin. Chem. 41/5, 700-6 (1995) ist der Stand der Technik der Entwicklung auf dem Gebiet der Analyse genetischer Polymorphismen mit sogenannten Oligonukleotid-Arrays beschrieben.

Das Hauptproblem des Standes der Technik ist, daß die Schmelztemperaturen der gewählten sequenzspezifischen Oligonukleotide mit der zu sequenzierenden oder nachzuweisenden Nukleinsäure unterschiedlich sind. Dies muß durch aufwendige Wahl der Länge der Oligonukleotide, deren Basenzusammensetzung und Optimierung der Position der Mismatche innerhalb des Oligonukleotids sowie der Salzkonzentration des Hybridisierungsgemisches optimiert werden. In vielen Fällen ist es dennoch praktisch unmöglich, nahe verwandte

Sequenzen simultan voneinander zu unterscheiden. Kritisch ist auch die Hybridisierungstemperatur. Bereits Variationen von 1 bis 2 °C können zu Modifikationen in der Intensität oder zu falsch-negativen Befunden führen. Fehlerhafte Analyseergebnisse sind gerade bei der Diagnose basierend auf der Anwesenheit von Punktmutationen sehr schwerwiegend.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein alternatives Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis von Nukleinsäuren und dafür geeignete Materialien zur Verfügung zu stellen.

Die Erfindung wird gelöst durch einen festen Träger, an dessen Oberfläche an vorbestimmten, unterschiedlichen Stellen zwei oder mehr Nukleinsäureanaloge unterschiedlicher Basensequenz gebunden sind. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis einer Nukleinsäure unter Verwendung dieses festen Trägers.

Unter einem festen Träger wird im Sinne der Erfindung ein Gegenstand verstanden, der eine so weit ausgedehnte Oberfläche hat, daß auf ihr einzelne Bereiche unterschieden werden können. Diese Oberfläche ist bevorzugt flach und größer als 5 mm<sup>2</sup>, bevorzugt zwischen 10 mm<sup>2</sup> und ca. 100 cm<sup>2</sup>. Das Material des Trägers ist nicht flüssig und nicht gasförmig und löst sich bevorzugt nicht bzw. nicht vollständig in Probenflüssigkeiten bzw. Reaktionsgemischen, die für die Immobilisierung von Nukleinsäuren an der Oberfläche verwendet werden, auf. Beispiele für solche Materialien sind beispielsweise Glas, Kunststoffe (z. B. Polystyrol, Polyamid, Polyethylen, Polypropylen), Gold o.ä.. Das Material muß jedoch nicht unbedingt selbst vollständig fest sein, sondern kann beispielsweise durch Befestigung an Stützmaterialien fest gemacht werden.

Die äußere Form des festen Trägers richtet sich im wesentlichen nach der Art, mit der die Anwesenheit von Nukleinsäuren an diesem festen Träger detektiert werden soll. Es hat sich beispielsweise als zweckmäßig erwiesen, eine im wesentlichen planare Form zu wählen, z. B. ein Plättchen.

Besonders geeignete feste Träger sind daher z. B. Polystyrolplättchen einer Dicke von ca. 1 bis 5 mm, einer Fläche von ca. 1 bis 5 cm<sup>2</sup>. Als besonders geeignet haben sich Membranen aus Polyamid mit einer Größe von 4 x 2,5 cm<sup>2</sup> erwiesen. An unterschiedlichen Stellen der Oberfläche dieses Trägers sind zwei oder mehr Nukleinsäureanaloge unterschiedlicher Basensequenz gebunden. Diese Stellen oder Bereiche überlappen bevorzugt nicht

miteinander. Bevorzugt sind sie voneinander durch Oberflächenbereiche getrennt, an denen keine Nukleinsäureanaloge gebunden sind. Die Stellen, an denen die Nukleinsäureanaloge gebunden sind, werden im folgenden als Bindebereiche bezeichnet. Die Bindebereiche können unterschiedliche Formen haben, die im wesentlichen auch durch die Art der Herstellung des festen Trägers bzw. durch das Verfahren, mit dem die Nukleinsäureanaloge in den Bindebereichen gebunden sind, bestimmt werden. Die minimale Größe der Bindebereiche wird im wesentlichen bestimmt durch das Gerät, mit welchem das Ereignis der Bindung einer Nukleinsäure an Nukleinsäureanaloge eines Bereiches nachgewiesen wird. Es gibt derzeit schon Geräte, die Bindung an Bereichen von ca. 1 µm detektieren können. Eine Obergrenze der Größe der Bindebereiche ergibt sich aus Wirtschaftlichkeitsgründen und dem Wunsch, den festen Träger sinnvoll handhaben zu können.

Die Größe der Bindebereiche ergibt sich insbesondere auch durch die Verfahren, mit denen die Nukleinsäureanaloge auf die Oberfläche aufgetragen werden. Solche Verfahren werden später geschildert.

Die Anzahl der Bindebereiche auf dem festen Träger hängt von der beabsichtigten Verwendung des festen Trägers ab. Für den Nachweis einer bestimmten Punktmutation sind im einfachsten Fall nur zwei Bindebereiche erforderlich. Dabei enthält ein Bindebereich Nukleinsäureanaloge, die an der Position, an der die Punktmutation nachgewiesen werden soll, eine Base enthalten, die komplementär zu der Base in der Position der Normalsequenz ist, während der andere Bindebereich ein Nukleinsäureanaloges enthält, das an der entsprechenden Position eine Base enthält, die komplementär zu der Base der mutierten Sequenz ist. Andererseits können mit einem festen Träger, an dessen Oberfläche zwei in der Sequenz gänzlich voneinander verschiedene Nukleinsäureanaloge gebunden sind, zwei miteinander wenig verwandte Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen simultan nachgewiesen werden.

Als Nukleinsäureanaloge werden nicht-natürlich vorkommende Moleküle verstanden, die Nukleinsäuren über Basenpaarungen erkennen können. Sie enthalten daher eine spezifische Basensequenz, die zu einer Basensequenz einer nachzuweisenden Nukleinsäure vollständig komplementär ist. Die Basensequenz setzt sich daher bevorzugt im wesentlichen aus den natürlich vorkommenden Nukleobasen zusammen. Wenn die Spezifität der Basenpaarung nicht verlorengeht, sind jedoch auch Modifikationen an den Nukleobasen erlaubt.

Als komplementär zu einer Nukleinsäure werden insbesondere Nukleinsäureanaloge bezeichnet, die eine Basensequenz aufweisen, die in an die Nukleinsäure gebundenem Zustand Wasserstoffbrücken zu einer Basensequenz der Nukleinsäure nach dem Prinzip der Basenpaarung ausbildet. Diese Sequenz ist bevorzugt mindestens 8 Basen lang und besonders bevorzugt zwischen 8 und 25 Basen lang.

Die Nukleinsäureanaloge sind weiter dadurch definiert, daß sie sich von Nukleinsäuren strukturell zumindest im Grundgerüst (Backbone) unterscheiden. Als Grundgerüst in Nukleinsäuren oder in einem Nukleinsäureanalogen wird eine Struktur von im wesentlichen identischen Einheiten verstanden, von denen jede eine Base gebunden enthält. In den natürlich vorkommenden Nukleinsäuren ist das Grundgerüst ein Zuckerphosphat-Grundgerüst. In Nukleinsäureanalogen ist dieses Grundgerüst strukturell modifiziert, beispielsweise durch vollständigen oder teilweisen Ersatz des Zucker- oder Phosphatanteils durch andere chemische Einheiten, z. B. nicht-zyklischer Bauteile. Im Grundgerüst können sich im wesentlichen identische Einheiten auch abwechseln.

Im Folgenden werden einige Eigenschaften von Nukleinsäureanalogen angegeben, die die Auswahl von für die vorliegende Erfindung geeigneten Nukleinsäureanalogen erleichtern soll. Eine vorteilhafte Eigenschaft von Nukleinsäureanalogen ist es, wenn sie eine höhere Affinität zu sequenzkomplementären Nukleinsäuren haben als ein Oligonukleotid mit identischer Basensequenz. Ferner sind solche Nukleinsäureanaloge bevorzugt, die weniger Ladungen als ein korrespondierendes, gleich langes Oligonukleotid tragen bzw. Ladungen durch entgegengesetzte Ladungen zu kompensieren vermögen. Besonders bevorzugt sind im wesentlichen ungeladene Nukleinsäureanaloge. Besonders bevorzugte Nukleinsäureanaloge sind solche, deren Affinität zu komplementären Nukleinsäuren im wesentlichen nicht vom Salzgehalt der Hybridisierungsmischung abhängt.

Besonders geeignete Nukleinsäureanaloge sind die in WO 92/20702 und WO 92/20703 beschriebenen Verbindungen (Peptide Nucleic Acid, PNA, z. B. Nature 365, 566-568 (1993) und Nucl. Acids Res. 21, 5332-5 (1993)). Für die Beschreibung der Struktur der Nukleinsäureanaloge wird hiermit auf die genannten Patentanmeldungen verwiesen. Bevorzugte Nukleinsäureanaloge sind Verbindungen, die ein Polyamid-Grundgerüst aufweisen, das eine Vielzahl von Basen entlang dem Grundgerüst gebunden enthält, wobei jede Base an ein Stickstoffatom des Grundgerüsts gebunden ist. Unter

Nukleinsäureanalogen sollen jedoch auch Verbindungen fallen, wie sie in der EP-A-0 672 677 beschrieben sind. Weitere Nukleinsäureanaloge sind beschrieben in Recueil 91, 1069-1080 (1971), Methods in Molecular Biology 29, 355-389 (1993), Tetrahedron 31, 73-75 (1975), J. Org. Chem. 52, 4202-4206 (1987), Nucl. Acids Res. 17, 6129-6141 (1989), Unusual Properties of New Polymers (Springer Verlag 1983), 1-16, Specialty polymers (Springer Verlag 1981), 1-51, WO 92/20823, WO 94/06815, WO 86/05518 und WO 86/05519. Weitere Nukleinsäureanaloge sind beschrieben in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7864-7868 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6097-6101 (1995) und J. Am. Chem. Soc. 117, 6140-6141 (1995). Die genannten Nukleinsäureanaloge haben eine Länge von 8 bis 30 Basen, besonders vorteilhaft ist eine Länge von 10 bis 25 Basen. Die genannten Nukleinsäureanaloge sind direkt oder indirekt an die Oberfläche des festen Trägers gebunden. Die Art der Bindung hängt im wesentlichen davon ab, welche reaktiven Gruppen auf dem festen Träger zur Bindung zur Verfügung stehen und welche reaktiven Gruppen an dem Nukleinsäureanalogon für eine Bindung zur Verfügung stehen, ohne die Bindefähigkeit des Nukleinsäureanalogons an eine komplementäre Nukleinsäure zu unterbinden, und ob die Nukleinsäureanalogen simultan an unterschiedliche Stellen gebunden oder an diesen aufgebaut werden sollen. Darüber hinaus kann es zweckmäßig sein, die Oberfläche des festen Trägers mit einer Schicht eines besser bindefähigen Materials zu überziehen oder die Oberfläche durch eine chemische Reaktion zu aktivieren. Reaktive Gruppen an der Oberfläche eines festen Trägers sind üblicherweise ausgewählt aus der Gruppe -OH, -NH<sub>2</sub> und -SH. Reaktive Gruppen von Nukleinsäureanalogen sind bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH, -SO<sub>3</sub>H und -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>.

Besonders bevorzugt sind die reaktiven Gruppen der Oberfläche und des Nukleinsäureanalogons kovalent miteinander verbunden, insbesondere durch einen Linker von mehr als 15 Atomen und weniger als 200 Atomen Länge. Unter einem Linker wird ein Molekülteil verstanden, der im wesentlichen die Funktion hat, die Nukleinsäureanalogen sterisch zugänglich an der Oberfläche des festen Trägers zu entfernen. Üblicherweise wird der Linker so gewählt, daß er neben Kohlenstoffatomen (z. B. in Alkyleneinheiten) mehrere Heteroatome (z. B. -O- oder -NH- oder -NR-) enthält, die die Solvatisierung erleichtern. Bevorzugt enthält der Linker eine oder mehrere Ethylenoxy-Einheiten oder/und Peptidgruppen. Besonders bevorzugt enthält der Linker eine oder mehrere Einheiten, wie sie in der DE-A 3924705 beschrieben sind. Besonders bevorzugt sind die dort beispielhaft beschriebenen Einheiten, die im Folgenden mit der Bezeichnung Ado (8-Amino-3,6-dioxa-octansäure)



bezeichnet werden. Eine geringe Abhängigkeit der Bindung von Nukleinsäuren an die PNA-Oberfläche kann durch längere Linker zwischen PNA und dem festen Träger reduziert werden.

Bei dem Nukleinsäureanalog, das an einer Stelle gebunden ist, kann es sich auch um ein Gemisch von zwei oder mehr Analogon unterschiedlicher, aber bekannter Sequenzen handeln. Damit kann die Anzahl von erforderlichen Stellen für eine multiple Bestimmung reduziert werden.

Die Oberfläche des Trägers ist bevorzugt nicht geladen und bevorzugt hydrophil. Es hat sich nämlich als Ergebnis der Erfindung herausgestellt, daß die Verwendung im wesentlichen ungeladener Oberflächen für den Nachweis von Nukleinsäuren vorteilhaft ist.

Ein mit Nukleinsäureanalogon an unterschiedlichen Stellen beladener fester Träger im Sinne der Erfindung kann auf unterschiedliche Weise hergestellt werden. In einer ersten Ausführungsform werden geeignete Mengen von Lösungen, die jeweils unterschiedliche Nukleinsäureanaloge enthalten, auf die Oberfläche des festen Trägers an unterschiedlichen Stellen aufgegeben, z. B. aufpipettiert. Die aufgegebenen Flüssigkeitsmengen sollen sich hierbei nicht vermischen. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß die Aufgabestellen weit voneinander entfernt liegen oder die Ausbreitung der Flüssigkeit durch eine hydrophobe Sperre zwischen den unterschiedlichen Stellen gestoppt wird. Bevorzugt sind entweder die Nukleinsäureanalogon oder die Oberfläche des festen Trägers für die Reaktion aktiviert. Eine solche Aktivierung kann beispielsweise dadurch vorgenommen werden, daß eine der oben genannten Gruppen durch Erzeugung einer reaktiven Spezies, im Falle einer Carboxylgruppe beispielsweise eines aktivierten Esters (z. B. eines N-Hydroxysuccinimidesters), der mit einer Hydroxylgruppe ohne weitere Aktivierung schnell eine Esterbindung eingeht, aktiviert wird. Geeignet aktivierte Polyamidmembranen tragen beispielsweise Triazin-Gruppen, die mit Aminogruppen von Nukleinsäureanalogon unter Bildung einer kovalenten Bindung reagieren können. Die Aktivierung kann auch über bifunktionelle Reagenzien, Quadratsäurederivate nach WO 95/15983 oder mittels Glutaraldehyd (GB 2197720) geschehen.

Die Bindung der Analogon kann jedoch auch realisiert werden, indem die Trägeroberfläche mit Nukleotidsequenzen beschichtet wird, die komplementär sind zu einem Teil der Sequenz

der Nukleotidanalogen. Die Bindung der unterschiedlichen Nukleinsäureanalogen kann an den Bindebereichen simultan oder auch aufeinanderfolgend vorgenommen werden.

Nach für die Bindung ausreichender Zeit hat es sich als vorteilhaft erwiesen, eventuell nicht oder nur ungenügend gebundene Nukleinsäureanaloge sowie eventuell verwendete Binde-reagenzien durch Abwaschen zu entfernen. Dies geschieht bevorzugt unter Bedingungen, bei denen nicht-gebundene Nukleinsäureanaloge nicht mit an anderen Bereichen gebundenen Nukleinsäureanalogen Bindungen eingehen können.

Prinzipiell ist es jedoch auch möglich, die Nukleinsäureanaloge an den unterschiedlichen Stellen der Oberfläche nacheinander aus Monomereinheiten aufzubauen. Hierzu kann die in WO 92/10092 oder WO 90/15070 beschriebene Technologie eingesetzt werden. Entsprechende Monomeren sind z. B. in WO 92/20702 beschrieben.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis einer Nukleinsäure mit Hilfe des erfindungsgemäßen festen Trägers.

Nachweisbare Nukleinsäuren sind natürliche oder künstliche Nukleinsäuren. Unter Nukleinsäuren werden demnach auch Nukleinsäureanaloge verstanden. Insbesondere handelt es sich bei der nachzuweisenden Nukleinsäure jedoch um RNS oder DNS, die für einen nukleinsäurehaltigen Organismus, z. B. ein Virus, ein Bakterium, einen Mehrzeller, ein Plasmid oder einen genetischen Zustand, z. B. eine Prädisposition oder Veranlagung für eine bestimmte Krankheit oder Spontanmutation in einem Gen charakteristisch sind. Hierbei handelt es sich im wesentlichen um RNS und DNS, sowohl genomischen als auch davon abgeleiteten Ursprungs. Eine wichtige Klasse von Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung sind die Resultate einer Nukleinsäure-Amplifikation. Diese werden im folgenden auch als Amplifikate oder Amplikons bezeichnet. Die Nukleinsäuren können entweder in ihrer Rohform oder in aufgereinigter oder bearbeiteter Form vorliegen. Eine Aufreinigung kann beispielsweise dadurch vorliegen, daß die Nukleinsäuren in einem vorbereiteten Schritt von Zellbestandteilen abgetrennt werden, beispielsweise durch einen Affinitätstrennschritt. Außerdem können die Nukleinsäuren enzymatisch verlängert, spezifisch amplifiziert oder transkribiert sein.

Der erfindungsgemäße Träger hat zum sequenzspezifischen Nachweis der Nukleinsäure an einer Stelle ein Nukleinsäureanaloges gebunden, welches eine Basensequenz aufweist, die

komplementär zu einer Basensequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure ist. Diese Basensequenz wird so gewählt, daß sie eine Aussage über das spezifische Vorliegen der Nukleinsäure zuläßt. Dies bedeutet im Regelfall, daß möglichst wenig, bevorzugt jedoch keine weitere Nukleinsäure der gleichen Totalsequenz in der Mischung vorliegen. Es muß jedoch festgestellt werden, daß es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Trägers auch möglich ist, Gruppen von Nukleinsäuren spezifisch nachzuweisen. Beispielsweise kann es Aufgabe des Verfahrens sein, irgend welche Mitglieder einer bestimmten taxonomischen Gruppe, z. B. einer Bakterienfamilie, über ihre Nukleinsäuren nachzuweisen. In diesem Fall kann die Basensequenz des Nukleinsäureanalogens so gewählt werden, daß sie in einem konservierten Bereich liegt, diese Sequenz jedoch nur in Mitgliedern dieser taxonomischen Gruppe vorkommt.

An einer hiervon unterschiedlichen Stelle auf der Oberfläche ist bevorzugt ein weiteres Nukleinsäureanaloges gebunden, das eine Basensequenz aufweist, die nicht zu der selben Basensequenz komplementär ist. Es kann sich um ein Nukleinsäureanaloges handeln, dessen Basensequenz kürzer oder länger sein kann oder welches sich in seiner Basensequenz von dem ersten Nukleinsäureanalogen in einer oder mehreren Basen unterscheidet. Worin der Unterschied in der Basensequenz besteht, hängt von der zu lösenden Aufgabe ab. Bei den Unterschieden kann es sich z. B. um Punktmutationen, kleinere Deletionen und Insertionen handeln. Bei manchen Erbkrankheiten, z. B. Cystischer Fibrose, unterscheiden sich die Sequenzen der Nukleinsäureanaloge in einzelnen Positionen (Punktmutationen) und mehreren Positionen (Deletionen, siehe bei  $\Delta$  508).

Die nachzuweisende Mutation ist bevorzugt nahe der Mitte der Basensequenz des Analogens positioniert.

Die Sequenzen der Analoge können auch so gewählt werden, daß sich bei gleichbleibender Länge ihre Hybridisierungspositionen um jeweils eine Base unterscheiden (überlappend). Die Sequenzen können auch so gewählt sein, daß die Bereiche der Hybridisierung benachbart auf der nachzuweisenden Nukleinsäure liegen.

Es können auch mehrere Mutationen in derselben oder verschiedenen Nukleinsäuren nachgewiesen werden, indem Nukleinsäureanaloge gewählt werden, deren Sequenz komplementär ist zu Sequenzen auf diesen Nukleinsäuren.

In einem besonders einfach gelagerten Fall, bei dem festgestellt werden soll, welches von zwei Allelen in einer Mischung vorhanden ist, werden an unterschiedlichen Stellen der Oberfläche des festen Trägers zwei Nukleinsäureanaloge gebunden, die sich in ihrer Basensequenz genau in der Position unterscheiden, in der sich auch die Allele unterscheiden. Somit wird ein Nukleinsäureanaloges komplementär zu einer bestimmten Sequenz des einen Allels und das andere Nukleinsäureanaloge komplementär zu der Sequenz des anderen Allels gewählt. Länge und Hybridisierungsstelle der Nukleinsäureanaloge sind gleich.

Bei Cystischer Fibrose beispielsweise wird üblicherweise ein Nachweis aller Allele durchgeführt. Der Wild-Typ enthält zwei gesunde Allele, Heterozygote enthalten eine mutierte und eine Wild-Typ-Sequenz und homozygote Mutanten enthalten zwei mutante Nukleinsäuren. In diesem Fall soll nicht nur festgestellt werden, ob Mutanten vorliegen, sondern ob es sich um einen heterozygoten oder den homozygoten Fall handelt. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es möglich, beide Allele gleichzeitig quantitativ nachzuweisen und somit zwischen den genannten 3 Fällen zu differenzieren.

In manchen Fällen, insbesondere in der Onkologie und bei der Bestimmung von Infektionsparametern, liegen mutierte Zellen/Partikel oft in einem Hintergrund von nicht-mutierten/normalen Zellen vor. Der selektive Nachweis ist in solchen Fällen mit Verfahren des Standes der Technik nicht sicher oder gar nicht möglich. So erfordert die Analyse von ras-Mutationen aus DNA aus Stuhl den sicheren Nachweis einer mutierten Sequenz in Gegenwart von ca. 100 normalen Sequenzen (Science 256, 102-105, (1992)). Auf dem Gebiet der Infektionsparameter wäre es wünschenswert, unterschiedliche HIV-Populationen in einem infizierten Patienten zu bestimmen. Von diesen liegen manche Mutanten jedoch in einer Menge von weniger als 2 % verglichen mit allen HIV-Sequenzen vor. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es daher besonders gut möglich, Gemische von zueinander sehr ähnlichen Nukleinsäuren zu untersuchen, selbst wenn eine der Nukleinsäuren in sehr großem Überschuß gegenüber der zu bestimmenden Nukleinsäure vorliegt.

Bevorzugt sind die Längen der gebundenen Nukleinsäureanaloge gleich. Als zweckmäßig hat sich die Auswahl einer Länge von zwischen 10 und 100, bevorzugt 10 und 50, Basen erwiesen. Für den Fall der Verwendung von Nukleinsäureanaloge einer Länge zwischen 10 und 25 Basen lassen sich besonders gute Ergebnisse erzielen.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die nukleinsäurehaltige Probe mit den Stellen auf der Oberfläche des Trägers in Kontakt gebracht, welche die Nukleinsäureanalogen gebunden haben. Dies kann beispielsweise durch Einbringen des festen Trägers in die Probenflüssigkeit oder Aufgießen der Probenflüssigkeit auf den festen Träger in einer oder mehreren Portionen geschehen. Die Nukleinsäuren der Probenflüssigkeit können vor dem Inkontaktbringen mit dem Träger in denaturiertem (einzelnsträngigem) Zustand vorliegen. Ein großer Vorteil der Erfindung ist jedoch, daß, z. B. durch Verwendung von PNAs, eine Denaturierung vor Inkontaktbringen unterlassen werden kann. Die PNAs verdrängen einen Strang aus eventuell doppelsträngiger zu bestimmender Nukleinsäure. Wesentlich ist nur, daß das Inkontaktbringen unter Bedingungen geschieht, bei denen die nachzuweisende Nukleinsäure über das zu einer Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäureanaloge an die betreffende Stelle der Oberfläche spezifisch bindet. Diese Bedingungen können zwar für unterschiedliche Arten von Nukleinsäureanalogen unterschiedlich sein, sie sind jedoch bei gegebenen Nukleinsäureanalogen auf einfache Weise durch Austesten erhältlich. Im Regelfall werden sich diese Bedingungen an den Bedingungen orientieren, wie sie für mit Oligonukleotiden geladene Träger bekannt sind. Für den Fall der Verwendung von Nukleinsäureanalogen gemäß WO 92/20702 können jedoch Bedingungen gewählt werden, die deutlich unterschiedlich von den Hybridisierungsbedingungen entsprechender Oligonukleotide sind. Insbesondere hat es sich als zweckmäßig erwiesen, deutlich weniger Salze einzusetzen als bei der Verwendung entsprechender Oligonukleotide. Beispielsweise ist die Anwesenheit von weniger als 100 mM, besonders bevorzugt weniger als 50 mM und ganz besonders bevorzugt von weniger als 10 mM Salzen hervorzuheben. Unter diesen Bedingungen könnte mit Oligonukleotiden gleicher Sequenz keine ausreichende Unterscheidung zwischen sequenzähnlichen Nukleinsäuren erreicht werden.

Die Probe wird solange in Kontakt mit der Oberfläche gehalten, wie für eine ausreichende Bindung der Nukleinsäure an die betreffende Stelle der Oberfläche erforderlich ist. Dieser Zeitraum liegt üblicherweise im Bereich weniger Minuten.

Anschließend wird bestimmt, ob und an welcher Stelle eine Bindung einer Nukleinsäure an die Oberfläche stattgefunden hat. Dies wird als ein Zeichen der Anwesenheit einer Nukleinsäure gewertet, die eine zu dem an dieser Stelle gebundenen Nukleinsäureanaloge

komplementäre Basensequenz enthält. Die Bestimmung der stattgefundenen Bindung kann auf unterschiedliche Weise geschehen.

Zwar gibt es mittlerweile schon Geräte, mit denen Veränderungen von Oberflächen an ganz bestimmten Stellen direkt festgestellt werden können. Für Verfahren, die solche Geräte benutzen, ist es nicht einmal erforderlich, die auf die Oberfläche aufgegebene nukleinsäurehaltige Probe wieder von der Oberfläche zu entfernen. Im Regelfall wird jedoch bevorzugt die nach Inkontaktbringen auf der Oberfläche befindliche Flüssigkeit von der Oberfläche entfernt und eventuell noch anhaftende Reagenzrückstände durch eine Waschlösung entfernt. Dies hat auch den Vorteil, daß Probenbestandteile, die mit der Bestimmung der Bindung interferieren könnten, abgewaschen werden.

Die Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure an das Nukleinsäureanaloge kann in vorteilhafter Weise dadurch geschehen, daß ein in die nachzuweisende Nukleinsäure in einem vor dem Inkontaktbringen mit der Oberfläche liegenden Schritt eingebrachte Markierung nachgewiesen wird. Hierbei kann es sich beispielsweise um eine nachweisbare Gruppe, z. B. einen fluoreszierenden Rest, handeln. Diese Bestimmung kann sowohl optisch mit Hilfe eines Mikroskopes, als auch in einer dafür vorgesehenen Meßzelle vorgenommen werden. Während der Ort der stattgefundenen Bindung ein Hinweis auf das Vorhandensein einer Nukleinsäure mit einer bestimmten Sequenz ist, kann die Menge an Markierung an einer vorbestimmten Stelle als ein Zeichen für die Menge der Anwesenheit der nachzuweisenden Nukleinsäure ausgenutzt werden.

Besonders bevorzugt sind die nachzuweisenden Nukleinsäuren Resultate einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion wie der Polymerasen-Kettenreaktion nach EP-B-0 202 362 oder NASBA nach EP-A-0 329 822. Wesentlich für die Amplifikation ist, daß die Nukleinsäuresequenz, die zur Bindung mit dem Nukleinsäureanaloge vorgesehen ist, durch das Amplifikationsverfahren vermehrt wird. Je sequenztreuer die Amplifikation geschieht, d. h. je weniger Fehler während der Amplifikation in die Sequenz eingebaut werden, desto geeigneter ist das Amplifikationsverfahren. Als besonders geeignet hat sich die Polymerase-Kettenreaktion erwiesen. Die Primer zur Amplifikation werden so gewählt, daß die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz in dem Bereich zwischen den Primerhybridisationsstellen liegt.

Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die für die Nachweisreaktion erforderliche Markierung während der Amplifikation in die Amplifikate einzubauen. Dies kann beispielsweise geschehen durch Einsatz markierter Primer oder markierter Mononukleosidtriphosphate.

Ein direkter Nachweis der stattgefundenen Bindung ohne Einbau einer Markierung ist beispielsweise möglich durch Einsatz eines interkalierenden Agens. Diese Agenzien haben die Eigenschaft, sich selektiv an doppelsträngigen basenhaltigen Verbindungen, darunter auch dem Komplex aus dem Nukleinsäureanalogon und der sequenzspezifisch gebundenen Nukleinsäure, einzulagern. Anhand spezifischer Eigenschaften der interkalierenden Agenzien, z. B. einer Fluoreszenz, kann das Auftreten der Komplexe nachgewiesen werden. Ein besonders geeignetes Agens ist Ethidiumbromid.

Eine weitere Möglichkeit, die Hybride ohne Einbau eines Labels zu erfassen, ist mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz gegeben, z. B. nach EP-A-0 618 441.

In einer anderen Möglichkeit der Bestimmung der stattgefundenen Bindung wird die Oberfläche mit einer Lösung eines nachweisbar markierten Antikörpers gegen den Komplex aus Nukleinsäureanalogon und nachzuweisender Nukleinsäure in Kontakt gebracht. Solche Antikörper sind beispielsweise beschrieben in WO 95/17430.

Der Nachweis der Hybride richtet sich nach der Art der Markierung. Es kann sich beispielsweise um einen Scanner, eine CCD-Kamera oder ein Mikroskop handeln.

Mit der vorliegenden Erfindung können vielerlei Vorteile realisiert werden. Insbesondere ist es möglich, auch Sequenzunterschiede in Nukleinsäurebereichen zu erfassen, die innerhalb von Sekundärstrukturen liegen. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, die Sensitivität des Nachweises zu steigern, da mit ihm die absolute Menge an gebundener nachzuweisender Nukleinsäure höher sein kann als bei herkömmlichen Verfahren. Insbesondere ist es auch möglich, die Signal-/Rauschverhältnis gegenüber Verfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden zu erhöhen. Im ersten Versuch war ein Signal-/Rauschverhältnis von weniger als 1 : 1000 erhältlich.

Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung liegen auf mindestens zwei Gebieten. Im ersten Fall wird der feste Träger zum Nachweis von bekannten Mutationen und Polymorphismen benutzt. Hierfür ist die Anzahl an zu bestimmenden Mutationen und Polymorphismen ein

Maß für die erforderliche Anzahl unterschiedlicher Nukleinsäureanaloge bzw. Stellen auf der Oberfläche. Die Sequenz der Nukleinsäureanalogen ist speziell auf die Sequenz der Nukleinsäuren um die Mutationen und Polymorphismen abgestimmt. Die Sequenzen werden bevorzugt so gewählt, daß die Base, in der sich sequenzähnliche Nukleinsäureanaloge unterscheiden, in oder nahe der Mitte der Sequenz liegt.

Die erfindungsgemäßen Träger können auf folgenden Gebieten eingesetzt werden:

Infektionskrankheiten, simultane Bestimmung unterschiedlicher Analyten/Parameter, aber auch Untersuchung des Zustandes eines Genes in einem Bakterium oder Virus, z. B. Multidrug-Resistance.

Onkologie (Nachweis von Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen und Bestimmung des Verhältnisses mutierter zu normaler Zellen.

Untersuchung von Erbkrankheiten (Cystische Fibrose, Sichelzellanämie, etc.).

Typisierung von Geweben und Knochenmark (MHC-Komplex) (siehe Clin. Chem. 41/4, 553-5 (1995)).

In einer zweiten Anwendungsmöglichkeit kann eine Sequenz kurzer Nukleinsäurefragmente nach dem Verfahren der sogenannten Sequencing by Hybridization bestimmt werden. Hierzu werden so viele unterschiedliche Nukleinsäureanaloge immobilisiert, wie sich Permutationen aus der gewählten Länge der Sequenz ergeben. Um eine ausreichende Spezifität zu erlangen, sind hierzu  $4^N$  Stellen erforderlich, wenn N die Anzahl von Basen in jedem Nukleinsäureanalogon ist. Bevorzugt liegt N zwischen 5 und 12. Für die Sequenzierung von sehr kurzen DNA-Fragmenten sind entsprechend weniger Stellen erforderlich. Das Verfahren zur Sequenzierung unbekannter Nukleinsäuren durch Sequencing by Hybridization ist in WO 92/10588 beschrieben.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß die Spezifität der Hybridisierung weitgehend unabhängig von den Bedingungen in der Probe ist. Dies erleichtert die simultane Bindung von Nukleinsäuren an unterschiedliche Bereiche der Oberfläche.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß Nukleinsäureanaloge, wie PNA, an der Festphase eine hervorragende Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen Sequenzen auf-



weisen. Diese Diskriminierung war besser als aus den Schmelztemperaturen analoger gelöster Verbindungen zu erwarten war.

Die erfindungsgemäßen Träger sind erstaunlicherweise sogar zur mehrfach hintereinander durchgeführten Bestimmung von Nukleinsäuren geeignet. Nach Durchführung einer Bestimmung wird der Träger in Kontakt mit einer Flüssigkeit einer Hitzebehandlung unterzogen. Als Temperatur wird eine solche gewählt, bei der die Bindung des Nukleinsäureanalogens an die gegebenenfalls gebundene Nukleinsäure gelöst wird. Danach steht der Träger für eine erneute Bestimmung zur Verfügung. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist zum ersten Mal eine Bestimmung relativer Mengen von nebeneinander in einer Probe vorhandenen sehr ähnlichen Nukleinsäuren in einem Konzentrationsbereich von mindestens zwei logs möglich. Eine quantitative Bestimmung von Mutanten war bislang z. B. über Sequenzierungsverfahren möglich. Die hierbei erhältliche Diskriminierung lag jedoch bei maximal 1 : 10.

Ferner ist es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich, doppelsträngige DNA ohne Denaturierung an die immobilisierten Nukleinsäureanaloge des festen Trägers zu binden. Vergleichende Studien haben gezeigt, daß dies mit immobilisierter DNA nicht möglich ist. Es hat sich außerdem gezeigt, daß mismatches, die nicht im Zentrum des Hybrids liegen, ebenfalls mit hoher Selektivität diskriminiert werden können.

In FIG. 1a sind die Sequenzen der PNA-Moleküle gezeigt, mit deren Hilfe das Verfahren beispielhaft erläutert wird. Die PNAs wurden nach WO 92/20702 hergestellt.

In FIG. 1b sind die Sequenzen der DNA-Moleküle gezeigt, die homolog zu den PNA Sequenzen aus FIG. 1a sind und für die DNA/ODN-Hybridisierungsexperimente verwendet wurden.

In FIG. 1c sind die Sequenzen der verwendeten komplementären Oligonukleotide (ODN) angegeben, die am 5'-Phosphat-Ende mit Hilfe des 5'-DIG-Endlabeling Kits (Boehringer Mannheim) mit Digoxigenin markiert bzw. mit Polynukleotidkinase und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP 5'-phosphoryliert wurden.

In FIG. 1d sind die denkbaren Kombinationen von Oligonukleotid (ODN) und PNA zur Bildung von Hybriden gezeigt. Identische Kombinationen gelten für Hybridisierungen zwischen DNA-Sonden (DNA, vgl. FIG. 1b) und Oligonukleotiden (ODN, vgl. FIG. 1c).

In FIG. 2 sind die Hybridisierungsergebnisse aus Beispiel 4 gezeigt, das die Selektivität der Methode verdeutlichen sollen. Die Bedingungen waren: 200 nl Spotvolumen (100; 10; 1; 0,1  $\mu$ M PNA, je eine Konzentration pro Spalte), Inkubation bei 45 °C.

In FIG. 3 sind die Hybridisierungsergebnisse aus Beispiel 6 gezeigt, das den Nachweis von PCR-Amplifikons durch immobilisierte PNA-Sonden belegt. Die Bedingungen waren: 200 nl Spotvolumen (100; 10; 1; 0,1  $\mu$ M PNA, je eine Konzentration pro Spalte) Inkubation bei 45 °C. Außerdem bedeuten:

- I    Kontrollexperiment, ODN 1a (1pMol, 1nM), Zeile 1 (PNA1), Zeile 2 (PNA2) Zeile 3 (PNA3)
- II   ss Amplifikat (118bp, einfach DIG-markiert)  
5 min. Hitzedenaturierung bei 94°C  
(50 $\mu$ l PCR-Ansatz verdünnt in 1ml Hybridisierungspuffer)  
Zeile 1 (PNA1), Zeile 2 (PNA2) Zeile 3 (PNA3)
- III   ds Amplifikat (118bp, einfach DIG-markiert)  
(50 $\mu$ l PCR-Ansatz direkt verdünnt in 1ml Hybridisierungspuffer)  
Zeile 1 (PNA1), Zeile 2 (PNA2) Zeile 3 (PNA3)

In FIG. 4 sind die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analyse von Analytgemischen durch PNA-Arrays gezeigt. Die Bedingungen waren: 200 nl Spotvolumen (100 $\mu$ M PNA, je eine der PNA pro Zeile, je ein Analytgemisch pro Spalte).

FIG. 5 zeigt den Einfluß der Linkerlänge auf die Hybridisierung. Die Bedingungen waren: 1 $\mu$ l Spotvolumen (100; 40; 20; 10; 5; 1  $\mu$ M PNA, je eine Konzentration pro Spalte, (Ado)<sub>3</sub>-PNA in Reihe 1, (Ado)<sub>6</sub>-PNA in Reihe 2, (Ado)<sub>9</sub>-PNA in Reihe 3). In FIG. 5 bedeuten:

- A. Vorhybridisierung / Hybridisierung in 5mM Natriumphosphat, 0.1% SDS, pH 7.0
- B. Vorhybridisierung / Hybridisierung in 10mM Natriumphosphat, 0.1% SDS, pH 7.0
- C. Vorhybridisierung / Hybridisierung in 25mM Natriumphosphat, 0.1% SDS, pH 7.0

Die FIG. 6a - 6c beweisen die Möglichkeit, PNA-derivatisierte Membranen nach der Regenerierung mehrfach zu verwenden. Die Bedingungen waren: 1 $\mu$ l Spotvolumen (100; 40; 20; 10; 5; 1  $\mu$ M PNA, je eine Konzentration pro Spalte).

In FIG. 6 bedeuten:

6a: Signalintensitäten nach der ersten Hybridisierung

6b: Signalintensitäten nach der Regenerierungsprozedur

Membran 1: keine Regenerierung (Kontrolle)

Membran 2: Regenerierung mit 0.1M Natronlauge, RT 1h, 2x 10min. bidest. Wasser RT

Membran 3: Regenerierung mit 1M Natronlauge, RT 1h, 2x 10min. bidest. Wasser RT

Membran 4: Regenerierung mit dest. Wasser, 70°C 1h, 2x 10min. bidest. Wasser RT

Membran 5: Regenerierung mit 0.1M Natronlauge, 70°C 1h, 2x 10min. bidest. Wasser RT

6c: Signalintensitäten nach der Rehybridisierung

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert:

## Beispiele

### Allgemeines:

Die benutzten Nukleinsäureanaloge wurden gemäß WO 92/20702 hergestellt. Chemikalien und Reagenzien waren, soweit nicht gesondert angegeben, von der Boehringer Mannheim GmbH.

### Beispiel 1:

#### Kovalente Derivatisierung von Nylonmembranen

200 nl einer Lösung, welche PNA in der gewünschten Konzentration in 0.5 M Natriumcarbonat pH 9.0 enthält, werden auf eine Immudyne ABC Membran (Pall) mit einer Pipette aufgetragen. Nach dem Trocknen der Spots werden noch vorhandene reaktive funktionelle Oberflächengruppen durch Waschen der Membran mit 0.1 M Natronlauge deaktiviert. Es wird mit Wasser nachgewaschen und danach die Membran getrocknet.

### Beispiel 2:

#### Nachweis eines Hybridisierungsereignisses durch Lumineszenz

Die Membran wird unter Verwendung von 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.1  $\mu\text{M}$  PNA-Lösungen wie unter Beispiel 1 beschrieben derivatisiert. Anschließend wird sie in einem 50 ml Hybridisierungsgefäß mit 10 ml Hybridisierungspuffer (10 mM Natriumphosphat pH 7.2, 0.1% SDS (Natriumdodecylsulfat)) im Hybridisierungssofen bei 45°C prähybridisiert. Nach 30 min. werden 10  $\mu\text{l}$  einer Lösung, die DIG-markiertes Oligonukleotid in 1  $\mu\text{M}$  Konzentration enthält, zugegeben und es wird weitere 60 min. hybridisiert. Danach wird 2 x 10 min. mit je 25 ml Waschpuffer (5 mM Natriumphosphat pH 7.2, 0.05% SDS) bei 45°C gewaschen. Die Nachweisreaktion wird gemäß dem Protokoll für die Digoxigenin Detektion (DIG-Detection-Kit, Boehringer Mannheim GmbH, BRD) durchgeführt. Dabei wird Anti-DIG-AP-Konjugat in einer Verdünnung von

1:10000 verwendet. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wird CDP-Star™ in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

### Beispiel 3:

#### Nachweis eines Hybridisierungsereignisses durch Fluoreszenz

Die Membran wird unter Verwendung 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M PNA-Lösung wie unter Beispiel 1 beschrieben derivatisiert. Die Membran wird in einem 50 ml Schraubgefäß mit 10 ml Hybridisierungspuffer (vgl. Beispiel 2) im Ofen bei 45°C prähybridisiert. Nach 30 min. werden 10  $\mu$ l einer Lösung, die ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid in einer Konzentration von 1  $\mu$ M enthält, zugegeben und es werden weitere 60 min. hybridisiert. Im Anschluß wird die Membran 2 x 10 min. mit je 25 ml Waschpuffer (vgl. Beispiel 2) bei 45°C gewaschen. Die Fluoreszenzintensitäten werden nach dem Trocknen der Membran gemessen.

### Beispiel 4:

#### Selektivität der Methode

Drei Membranstreifen werden mit jeweils drei (Ado)<sub>6</sub>-PNA-Molekülen, die sich in ihrer Basenabfolge an einer bzw. zwei Positionen unterscheiden (vgl. FIG. 1a, SEQ.ID.NOS. 1, 2, 3), unter Verwendung von PNA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 100  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M analog Beispiel 1 derivatisiert. Die Membranstreifen werden in 50 ml Schraubgefäßen mit 10 ml Hybridisierungspuffer 30 min. prähybridisiert. Anschließend wird jeweils eines der drei DIG-markierten Oligonukleotide (FIG. 1b, SEQ.ID.NOS. 4, 5, 6) zugegeben. Nach 60 min. Hybridisierungsdauer wird 2 x 10 min. mit je 25 ml Waschpuffer gewaschen. Die Hybridisierungsereignisse werden, wie in Beispiel 2 beschrieben, nachgewiesen.

In FIG. 1d sind alle möglichen doppelsträngigen Hybride zwischen den beteiligten PNA-Molekülen und den Oligonukleotiden dargestellt. Aus FIG. 2 ist ersichtlich, daß praktisch immer nur das Oligonukleotid nachgewiesen wird, welches zu dem immobilisierten

Nukleinsäureanalogen (PNA 1, PNA 2, PNA 3) exakt komplementär ist. Aus der Abbildung können außerdem die Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) abgeschätzt werden. Sie wurden quantitativ ausgewertet, die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

**Tabelle 1**

| Hybrid (PNA/ODN) | S/N   | Signal (Hybrid)/Signal (Match) |
|------------------|-------|--------------------------------|
| 1 / 1            | 655,2 | 100,0 %                        |
| 2 / 1            | 20,7  | 3,2 %                          |
| 3 / 1            | 10,3  | 1,6 %                          |
| 1 / 2            | 23,1  | 2,6 %                          |
| 2 / 2            | 871,8 | 100,0 %                        |
| 3 / 2            | 6,4   | 0,7 %                          |
| 1 / 3            | 109,4 | 22,7 %                         |
| 2 / 3            | 12,3  | 2,5 %                          |
| 3 / 3            | 481,1 | 100,0 %                        |

Beispiel 5:

## Quantifizierung

Membranstreifen werden mit drei (Ado)<sub>6</sub>-PNA-Molekülen, die sich in ihrer Basenabfolge (FIG. 1a, SEQ.ID.NOS. 1, 2, 3) unterscheiden, in einer Konzentration von 100 µM analog Beispiel 1 derivatisiert. Anschließend werden sie in 20 ml Hybridisierungsgefäßen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (vgl. Beispiel 2) bei 45°C prähybridisiert. Nach 30 min. wird der Puffer gewechselt. In den Experimenten 1 bis 7 unterscheidet sich der hinzugegebene Puffer in den Analytkonzentrationen der DIG-markierten Komponenten Oligonukleotid 1, 2 und 3, SEQ.ID.NOS. 4, 5, 6. Nach 60 min. Hybridisierungsdauer bei 45°C wird 2 x 10 min. mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und der Nachweis eines Hybridisierungsereignisses wird wie in Beispiel 2 geführt. Das Lumineszenzsignal wird mit einem Lumineszenz-Imager aufgezeichnet und anschließend ausgewertet (FIG. 4).

Die gefundenen Signalintensitäten ermöglichen sowohl eine qualitative als auch semiquantitative Aussage über die Zusammensetzung des Analytgemisches. Absolute quantitative Aussagen sind nach einer Eichung der Signalintensitäten möglich.

Beispiel 6:

## Nachweis von PCR-Amplikons

## A. Gewinnung eines geeigneten Analyten (Amplifikat)

In ein pUC19-Plasmid wird ein doppelsträngiges DNA-Fragment ligiert, dessen Sequenz komplementär zur PNA-Sonde PNA1 ist. Das Plasmid wird in E.coli transformiert, kloniert und anschließend sequenziert. Für die nachfolgenden Hybridisierungsexperimente wird ein Abschnitt der Plasmidsequenz amplifiziert und während der Amplifikationsreaktion DIG-markiert. Die Amplifikation wird in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Der Amplifikationsansatz besteht aus 1 µl Plasmid (1 ng/µl), 1 µl Primer F1 (10 µM), 1 µl DIG-Primer R1 (10 µM), 5 µl 10 x PCR Puffer (100 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM



KCl, pH 8.3), 2 µl dNTP-Lösung (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP in dest. Wasser pH 7.0), 0.5 µl Taq-Polymerase (5 Unit/µl) und 38.5 µl Wasser.

Primer F1: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' (SEQ.ID.NO. 12)

Primer R1: 5'-DIG-AAC AGC TAT GAC CAT GA-3' (SEQ.ID.NO. 13)

Jeder Reaktionsansatz wird 3 min. auf 96°C erhitzt und anschließend werden 30 Runden eines 3-Stufen PCR-Zyklus durchgeführt (45 sec. 96°C, 30 sec. 48°C, 1 min. 72°C). Im letzten Zyklus wird der Elongationsschritt um 5 min bei 72°C verlängert.

#### B. Hybridisierungsreaktion

Die Membranen werden mit jeweils drei (Ado)<sub>6</sub>-PNA-Sequenzen, die sich in ihrer Basenabfolge an einer bzw. zwei Positionen unterscheiden (vgl. FIG. 1a, SEQ.ID.NOS. 1, 2, 3), unter Verwendung von PNA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 100 µM und 0,1 µM analog Beispiel 1 derivatisiert. Die Vorbehandlung der Membran erfolgt in einem 20 ml Hybridisierungsgefäß mit 5 ml Hybridisierungspuffer bei 45°C. Nach 30 min. wird der Puffer gewechselt und die Analytlösung wird zugegeben. Für die Herstellung der Analytlösung wird der Amplifikationsansatz direkt (ds Amplicon) bzw. nach 5 min Hitzedenaturierung (ss Amplicon) in 1 ml Hybridisierungspuffer verdünnt. Nach 1 h, 2 h 30 min. bzw. 4 h Hybridisierung bei 45°C wird 2 x 10 min. mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen. Hybridisierungsereignisse werden, wie in Beispiel 2 beschrieben, nachgewiesen (FIG. 3).

In FIG. 3 sind 9 Felder zu sehen. Die Reihen unterscheiden sich in der Länge der Inkubationszeit (4 h, 2 ½ h und 1 h). Die Spalten unterscheiden sich in der Art der nachzuweisenden Nukleinsäure. In jedem der 3 Felder von Spalte I sind 3 übereinanderliegende Reihen von Spots aufgebracht. Die Reihen unterscheiden sich in der Sequenz der PNAs, während die Spalten jedes Feldes sich in der Konzentration unterscheiden. Sowohl die Spezifität als auch die Quantifizierbarkeit für den Fall von Oligonukleotiden als nachweisende Nukleinsäure gehen aus Spalte I hervor.

In der Abbildung ist der Einfluß der Inkubationszeit zu erkennen. Es wird klar, daß schon bei einstündiger Hybridisierung eine hervorragende Sequenz-Diskriminierung für ODN 1a und den Amplifikaten erreicht wird. Die Spalten II und III in FIG. 3 unterscheiden sich dadurch, daß im einen Fall ein zuvor einzelsträngig gemachtes Amplifikat und in Spalte III ein nicht zuvor einzelsträngig gemachtes Amplifikat als nachzuweisende Nukleinsäure eingesetzt werden. Aus den Signalen ist erkennbar, daß es nicht erforderlich ist, doppelsträngige Nukleinsäuren vor Aufbringung auf den festen Träger zu denaturieren. Dies führt zu einer Einsparung von Arbeitsschritten (Hitzeschritt, Einzelstrangseparation, Waschschritt) und verringert dadurch die Kontaminationsgefahr, so daß PNA-Sonden in Verbindung mit Niedrigsalzbedingungen deutliche Vorteile gegenüber DNA-Sonden zeigen.

#### Beispiel 7

##### Vergleich PNA / DNA Hybridisierung

Membranstreifen werden mit jeweils drei (Ado)<sub>6</sub>-PNA-Sequenzen (SEQ.ID.NOS. 1, 2, 3) sowie drei DNA-Molekülen (SEQ.ID.NOS. 8, 10, 11), die sich in ihrer Basenabfolge an einer bzw. zwei Positionen unterscheiden (vgl. FIG. 1a und 1b), unter Verwendung von 50 µM Lösungen analog Beispiel 1 derivatisiert. In Abänderung zu Beispiel 1 beträgt das Spotvolumen 400 nl statt 200 nl. Die Membranstreifen werden in 20 ml Hybridisierungsgefäßen wahlweise mit 5 ml Niedrigsalzpuffer (vgl. Beispiel 2) oder Hochsalzpuffer (6 x SSC: 0.9 M NaCl, 90 mM Natriumcitrat, 0.1 % SDS, pH 7.0) bei 37°C bzw. alternativ 45°C 30 min. prähybridisiert. Anschließend wird jeweils eines der drei Dig-markierten Oligonukleotide (FIG. 1c, SEQ.ID.NOS. 4, 5, 6) zugegeben. Nach 60 min. Hybridisierungsdauer wird 2 x 10 min mit je 5 ml Waschpuffer bei 37°C bzw. 45°C gewaschen. Für die Niedrigsalzexperimente wird der Waschpuffer aus Beispiel 2 verwendet und für die Hochsalzexperimente ein 1 x SSC-Puffer mit 0.02 % SDS, pH 7.0. Die Hybridisierungsereignisse werden wie in Beispiel 2 nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte quantitativ und ist in Tabelle 2 dargestellt.

Sowohl die DNA- als auch die PNA-Sonden sind in der Lage, vollständig komplementäre einzelsträngige Zielsequenzen von einzel- und doppelt fehlpaarenden Sequenzen zu unterscheiden. Deutliche Vorteile der PNA-Sonden gegenüber der DNA-Sonden ergeben

sich für bestimmte Arten der Fehlpaarung, besonders wenn diese nicht in der Mitte der Sequenz liegt, sondern terminal verschoben ist. Besonders deutlich wird dies am Beispiel einer dezentralen G/T-Fehlpaarung (Sonde 1 / ODN 3), die von der DNA-Sonde stärker toleriert wird als von der sequenzidentischen PNA-Sonde.

Tabelle 2

|       |                     | PNA bzw. DNA 1 | PNA bzw. DNA 2 | PNA bzw. DNA 3 |
|-------|---------------------|----------------|----------------|----------------|
| ODN 1 | PNA 45°C, low salt  | 100,0%         | 1,2%           | 1,5%           |
|       | DNA 37°C, high salt | 100,0%         | 1,2%           | 6,4%           |
| ODN 2 | PNA 45°C, low salt  | 1,1%           | 100,0%         | 2,9%           |
|       | DNA 37°C, high salt | <2% *          | 100,0%         | <2% *          |
| ODN 3 | PNA 45°C, low salt  | 26,0%          | 1,5%           | 100,0%         |
|       | DNA 37°C, high salt | 66,5%          | <2% *          | 100,0%         |

\* genauer Wert nicht bestimmbar, da Spotintensität kleiner als Standardabweichung des Untergrundsignals

### Beispiel 8

#### Einfluß der Länge des Linkers zwischen Membran und PNA-Sonden

Membranstreifen werden mit PNA-Molekülen (vgl. FIG. 1a, SEQ.ID.NOS. 7, 1, 9), die sich in der Länge des Linkers ( $\text{Ado}_3$ ,  $\text{Ado}_6$  bzw.  $\text{Ado}_9$ ) unterscheiden, unter Verwendung von PNA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  analog Beispiel 1 derivatisiert. In Abänderung zu Beispiel 1 beträgt das Spotvolumen 1  $\mu\text{l}$  statt 200 nl. Die Membranstreifen werden in Hybridisierungsgefäßen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (5, 10 bzw. 25 mM Natriumphosphat, 0.1 % SDS, pH 7.0) 30 min. bei 35°C prähybridisiert. Anschließend werden 10 pMol  $^{32}\text{P}$ -markiertes Oligonukleotid (vgl. FIG. 1c: ODN 1b, SEQ.ID.NO. 4) zugegeben und 60 min. bei 50°C hybridisiert. Die Membranen werden 2 x 10 min. mit 50 ml Waschpuffer (5 mM Natriumphosphat, 0.1 % SDS, pH 7.0) bei 50°C gewaschen. Der Nachweis von Hybridisierungsereignissen erfolgt durch Autoradiographie (FIG. 5) Der Abbildung kann entnommen werden, daß mit einem längeren Linker die Hybridisierung deutlich verbessert werden kann.

### Beispiel 9

#### Wiederverwendung von PNA-Membranen

Eine Membran wird mit  $(\text{Ado})_6$ -PNA-Molekülen (vgl. FIG. 1a: PNA 1b, SEQ.ID.NO. 1) unter Verwendung von PNA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  analog Beispiel 1 derivatisiert. Die PNA wird dabei in fünf identischen Konzentrationsreihen aufgetragen. Wie in Beispiel 8 beträgt das Spotvolumen 1  $\mu\text{l}$ . Die Membran wird in einem Hybridisierungsgefäß mit 10 ml Hybridisierungspuffer (10 mM Natriumphosphat, 0.1 % SDS, pH 7.0) 30 min. bei 35°C prähybridisiert. Anschließend werden 10 pMol  $^{32}\text{P}$ -markiertes Oligonukleotid (vgl. FIG. 1c: ODN 1b, SEQ.ID.NO. 4) zugegeben und 60 min. bei 50°C hybridisiert. Die Membran wird 2 x 10 min. mit 50 ml Waschpuffer (5 mM Natriumphosphat, 0.1 % SDS, pH 7.0) bei 50°C gewaschen. Der Nachweis von Hybridisierungsereignissen erfolgt durch Autoradiographie. (FIG. 6a). Nach der Autoradiographie wird die Membran in fünf identische Streifen geschnitten. Diese Membranstreifen werden im Verlauf des weiteren Experimentes unterschiedlich behandelt.

Membran 1 wird nicht inkubiert und dient als Kontrollmembran, Membran 2 wird 60 min. bei Raumtemperatur mit 50 ml 0.1 M Natronlauge inkubiert, Membran 3 für denselben Zeitraum mit 50 ml 1 M Natronlauge, Membran 4 wird 60 min. bei 70°C mit 50 ml dest. Wasser inkubiert und Membran 5 wird 60 min. bei 70°C mit 50ml 0.1 N Natronlauge inkubiert. Anschließend werden alle Membranen 2 x 10 min. mit dest. Wasser bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dieser Prozedur wird erneut eine Autoradiographie durchgeführt (FIG. 6b). Abschließend werden diese Membranstreifen ein weiteres Mal in einer Hybridisierungsreaktion wie beschrieben eingesetzt und die Hybridisierungsereignisse werden durch Autoradiographie nachgewiesen (FIG. 6c).

Wie FIG. 6b zeigt, erhält man durch die unterschiedlichen Behandlungsmethoden sehr verschiedene Resultate. Eine Behandlung mit bidest Wasser bei 70°C (Membran 4) bewirkt eine nahezu vollständige Regenerierung der Membran. Unerwarteterweise ist der Erfolg der Regenerierung schlechter, wenn Bedingungen verwendet werden, die i.a. für die Denaturierung von Nukleinsäuren üblich sind. So ergibt die Inkubation der Membran 3 mit 1 M Natronlauge bei Raumtemperatur kaum einen Regenerierungseffekt. Eine Erniedrigung der Natronlaugekonzentration von 1 M auf 0.1 M erhöht den Grad der Regenerierung sowohl bei Raumtemperatur (Membran 2) als auch 70°C (Membran 5). Keine dieser Bedingungen führt jedoch zu einem annähernd guten Regenerierungsgrad, wie dies mit bidest. Wasser der Fall ist (Membran 4). Das Beispiel zeigt, daß diese Bedingungen wichtige Parameter für die effiziente Denaturierung von membrangebundenen PNA/DNA-Doppelsträngen sind.

Unabhängig von der Regenerierungsmethode können alle Membranen zur erneuten Hybridisierung verwendet werden (FIG. 6c), ohne daß eine erhebliche Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses beobachtet wird. Bis zu 6 Rehybridisierungen konnten ohne merklichen Einfluß auf die Regenerierbarkeit oder die Rehybridisierungsfähigkeit der PNA-Membranen durchgeführt werden.

**Sequenzprotokoll****(1) ALLGEMEINE ANGABEN:****(i) ANMELDER:**

- (A) NAME:** Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE:** Sandhoferstr. 116
- (C) ORT:** Mannheim
- (E) LAND:** DE
- (F) POSTLEITZAHL:** 68298
- (G) TELEFON:** 0621 759 4348
- (H) TELEFAX:** 0621 759 4457

**(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:** Sequenzspezifischer Nachweis von Nukleinsäuren**(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN:** 13**(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:**

- (A) DATENTRÄGER:** Floppy disk
- (B) COMPUTER:** IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM:** PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE:** PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

**(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:****(i) SEQUENZKENNZEICHEN:**

- (A) LÄNGE:** 16 Aminosäuren
- (B) ART:** Aminosäure
- (C) STRANGFORM:** Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE:** linear

**(ii) ART DES MOLEKÜLS:** Peptid**(iii) HYPOTHETISCH:** NEIN

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:1

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)l)acetyl)-N-(2-amino(N'-hexa(8-amino-3,6-dioxa-octano-1-yl))-ethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:2

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaniny)l)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:3

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)l)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:4

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeniny)l)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:5

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is



N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:6

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:7

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:8

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:9

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:10

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:11..12

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:13

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:14

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:15

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-(1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LAGE:1
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-amino(N'-hexa(8-amino-3,6-dioxa-octano-1-yl))-  
ethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LAGE:2
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LAGE:3
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE:4  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE:5  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE:6  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE:7  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE:8  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"  
/note= "Xaa is  
N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:15

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-(1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine "

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:1

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-amino(N'-hexa(8-amino-3,6-dioxa-octano-1-yl))-ethyl)-beta-alanine"

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:2

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:3

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:4

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:5

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:6

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:7

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:8

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:9

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:10

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:11..12

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:13

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:14

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:15

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-(1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN



## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/ SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LÄGE: 15
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "markiert am 5'-Phosphat mit Digoxigenin über Aminolinker (Boehringer Mannheim GmbH, BRD) oder 32-P"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TAGTTGTGAC GTACA

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/ SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LÄGE: 15
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "markiert am 5'-Phosphat mit Digoxigenin über Aminolinker (Boehringer Mannheim GmbH, BRD)"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TAGTTGTCAC GTACA

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/ SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 15
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "markiert am 5'-Phosphat mit Digoxigenin über Aminolinker (Boehringer Mannheim GmbH, BRD)"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TAGTTGTGAT GTACA

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:1

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)acetyl)-N-(2-amino(N'-tri(8-amino-3,6-dioxa-octano-1-yl))-ethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:2

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaniny)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:3

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:4

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeniny)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:5

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:6

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:7

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:8

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:9

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:10

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:11..12

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:13

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:14

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:15

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-(1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TTTTTTTTTT TTTTTTGTAC GTCACAATA

30

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE: 1

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)l)acetyl)-N-(2-amino(N'-nona(8-amino-3,6-dioxa-octano-1-yl))-ethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:2

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaniny)l)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:3

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminy)l)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:4

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeniny)l)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:5

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:6

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-guaninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:7

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:8

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:9

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:10

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:11..12

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"



/note= "Xaa is

N-((1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:13

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-cytosyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:14

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-((1-thyminyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:15

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "OTHER"

/note= "Xaa is

N-(1-adeninyl)acetyl)-N-(2-aminoethyl)-beta-alanine "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TTTTTTTTTT TTTTTGTAC GTGACAACTA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

TTTTTTTTTT TTTTTGTAC ATCACAATA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/ SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 1

(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "A am 5'-Terminus ist mit Aminomodifier

(Boehringer Mannheim GmbH) an Digoxigenin gebunden"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AACAGCTATG ACCATGA

17

**Patentansprüche**

1. Fester Träger, an dessen Oberfläche an unterschiedlichen Stellen zwei oder mehr Nukleinsäureanaloge unterschiedlicher Basensequenz gebunden sind.
2. Träger gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäureanalogen kovalent gebunden sind.
3. Träger gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäureanalogen über einen Linker von mehr als 15 Atomen und weniger als 200 Atomen Länge gebunden sind.
4. Träger gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der feste Träger eine nicht geladene und/oder hydrophile Oberfläche hat.
5. Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis einer Nukleinsäure durch
  - Inkontaktbringen einer nukleinsäurehaltigen Probe mit den Stellen auf der Oberfläche eines Trägers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mindestens ein Nukleinsäureanaloges eine Basensequenz aufweist, die komplementär zu einer Basensequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure ist und wobei mindestens ein weiteres Nukleinsäureanaloges eine Basensequenz aufweist, die nicht zu einer Basensequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure komplementär ist, unter Bedingungen bei denen die nachzuweisende Nukleinsäure an das Nukleinsäureanaloge bindet;
  - Bestimmung der stattgefundenen Bindung an der vorbestimmten Stelle als ein Zeichen der Anwesenheit der nachzuweisenden Nukleinsäure.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Bedingungen, bei denen die nachzuweisende Nukleinsäure an das Nukleinsäureanaloge bindet, die Anwesenheit von weniger als 100 mM Salzen bedeuten.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die nachzuweisende Nukleinsäure Resultat einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion ist.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure nachweisbar markiert ist.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die stattgefundenene Bindung mit Hilfe eines interkalierenden Agens nachgewiesen wird.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die stattgefundenene Bindung mit Hilfe eines nachweisbar markierten Antikörpers gegen das Bindungsprodukt nachgewiesen wird.
11. Verfahren zum selektiven Nachweis von Mutanten von Nukleinsäuren in Gegenwart eines großen Überschusses von nicht-mutanten Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß die nukleinsäurehaltige Probe mit einem Träger gemäß Anspruch 1 in Kontakt gebracht wird und die Bindung der mutanten Nukleinsäuren oder/und der nicht-mutanten Nukleinsäuren an unterschiedliche Stellen bestimmt wird.
12. Verfahren zur Bestimmung der relativen Menge einer mutanten und einer normalen Nukleinsäure durch Inkontaktbringen einer nukleinsäurehaltigen Probe mit einem festen Träger gemäß Anspruch 1 und Ableitung einer Information für die Menge an mutanten Nukleinsäuren durch Vergleich der gebundenen mutanten Nukleinsäure und nicht-mutanten Nukleinsäure.
13. Verwendung eines festen Trägers gemäß Anspruch 1 zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren.

| 1/8  |        | SEQ. ID. NO |
|--|--------|-------------|
| H-ado <sub>3</sub> -TGT ACG TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub> | PNA 1a | 7           |
| H-ado <sub>6</sub> -TGT ACG TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub> | PNA 1b | 1           |
| H-ado <sub>9</sub> -TGT ACG TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub> | PNA 1c | 9           |
| H-ado <sub>6</sub> -TGT ACG TGA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub> | PNA 2  | 2           |
| H-ado <sub>6</sub> -TGT ACA TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub> | PNA 3  | 3           |

FIG. 1a

|  |       |    |
|--|-------|----|
| 5'-(T) <sub>15</sub> TGT ACG TCA CAA CTA -3' | DNA 1 | 8  |
| 5'-(T) <sub>15</sub> TGT ACG TGA CAA CTA -3' | DNA 2 | 10 |
| 5'-(T) <sub>15</sub> TGT ACA TCA CAA CTA -3' | DNA 3 | 11 |

FIG. 1b

|  |        |   |
|--|--------|---|
| Dig-5'-TAG TTG TGA CGT ACA -3'             | ODN 1a | 4 |
| <sup>32</sup> P-5'-TAG TTG TGA CGT ACA -3' | ODN 1b | 4 |
| Dig-5'-TAG TTG TCA CGT ACA -3'             | ODN 2  | 5 |
| Dig-5'-TAG TTG TGA TGT ACA -3'             | ODN 3  | 6 |

FIG. 1c

|  |                |
|--|----------------|
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACG TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGC AGT GTT GAT-5'-Dig | PNA 1<br>ODN 1 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACG TGA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGC AGT GTT GAT-5'-Dig | PNA 2<br>ODN 1 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACA TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGC AGT GTT GAT-5'-Dig | PNA 3<br>ODN 1 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACG TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGC ACT GTT GAT-5'-Dig | PNA 1<br>ODN 2 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACG TGA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGC ACT GTT GAT-5'-Dig | PNA 2<br>ODN 2 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACA TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGC ACT GTT GAT-5'-Dig | PNA 3<br>ODN 2 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACG TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGT AGT GTT GAT-5'-Dig | PNA 1<br>ODN 3 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACG TGA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGT AGT GTT GAT-5'-Dig | PNA 2<br>ODN 3 |
| H-ado <sub>6</sub> - TGT ACA TCA CAA CTA -Gly-NH <sub>2</sub><br>3' - ACA TGT AGT GTT GAT-5'-Dig | PNA 3<br>ODN 3 |

FIG. 1d



1nM ODN 1:

PNA 1

PNA 2 (G/G)

PNA 3 (A/C)

1nM ODN 2:

PNA 1 (C/C)

PNA 2

PNA 3 (A/C, C/C)

1nM ODN 3:

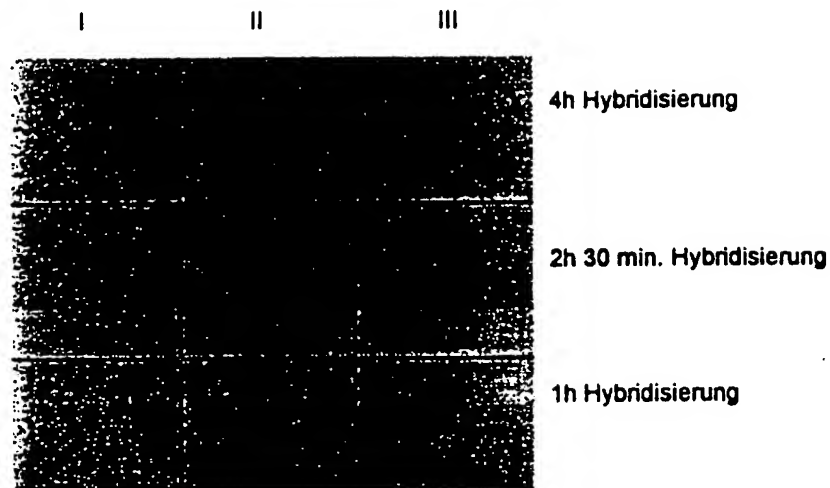
PNA 1 (G/T)

PNA 2 (G/T, G/G)

PNA 3

FIG. 2





- I     Kontrollexperiment, ODN 1a (1pMol, 1nM), Zeile 1 (PNA1), Zeile 2 (PNA2) Zeile 3 (PNA3)
- II    ss Amplifikat (118bp, einfach DIG-markiert)  
5 min. Hitzedenaturierung bei 94°C  
(50µl PCR-Ansatz verdünnt in 1ml Hybridisierungspuffer)  
Zeile 1 (PNA1), Zeile 2 (PNA2) Zeile 3 (PNA3)
- III   ds Amplifikat (118bp, einfach DIG-markiert)  
(50µl PCR-Ansatz direkt verdünnt in 1ml Hybridisierungspuffer)  
Zeile 1 (PNA1), Zeile 2 (PNA2) Zeile 3 (PNA3)

FIG. 3

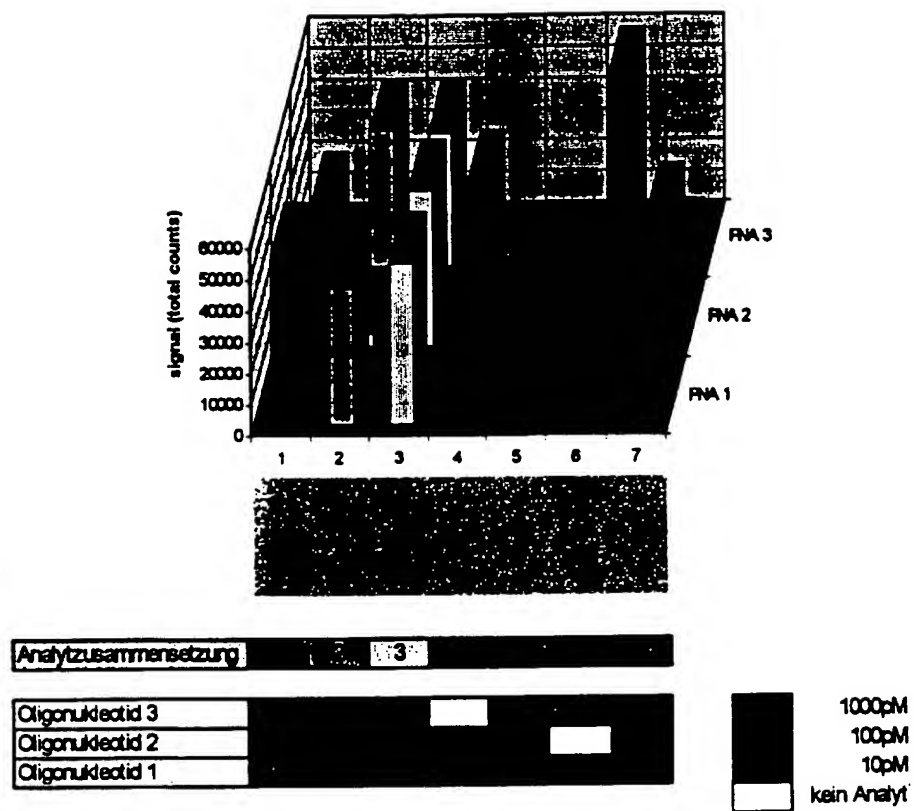
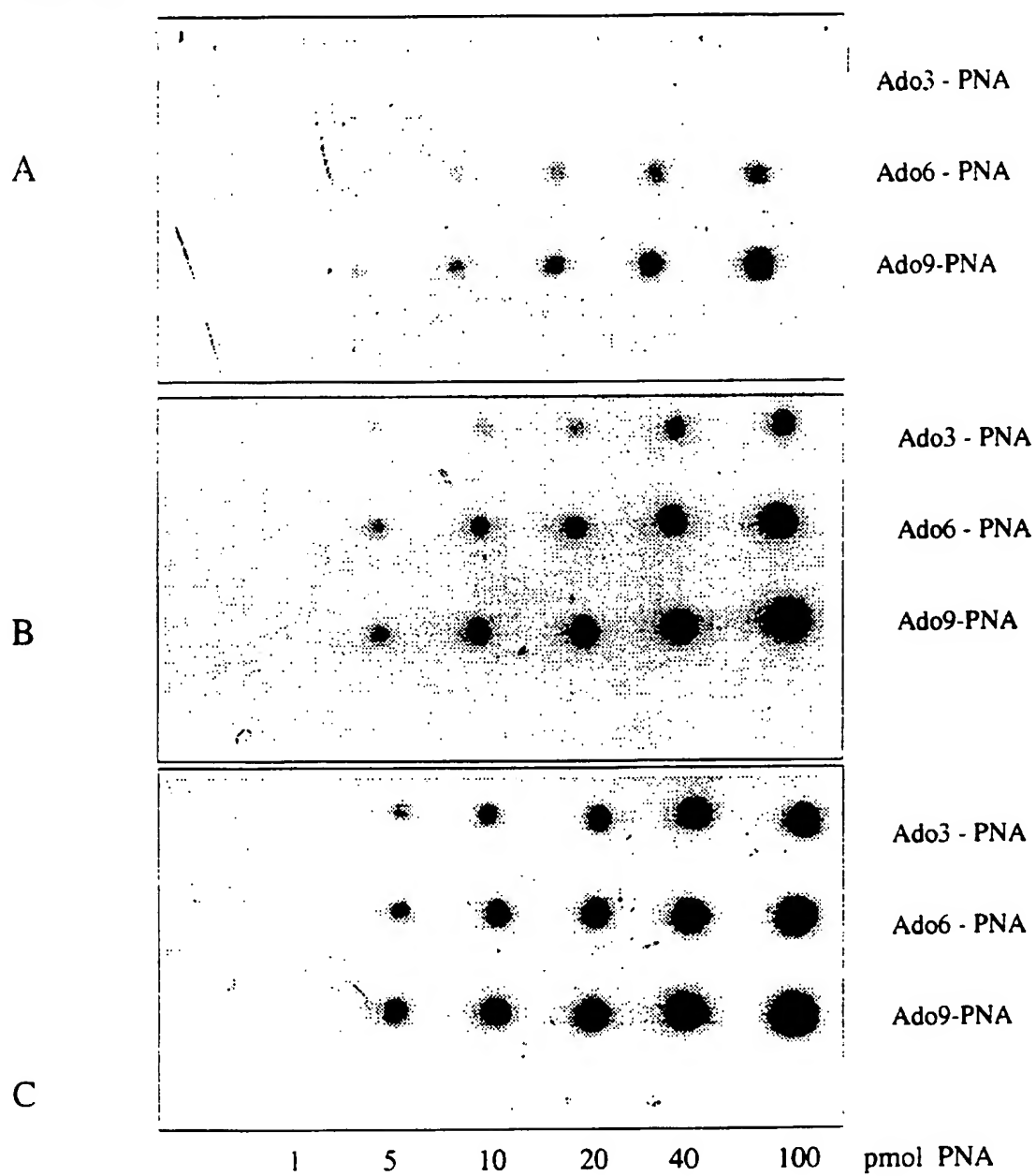
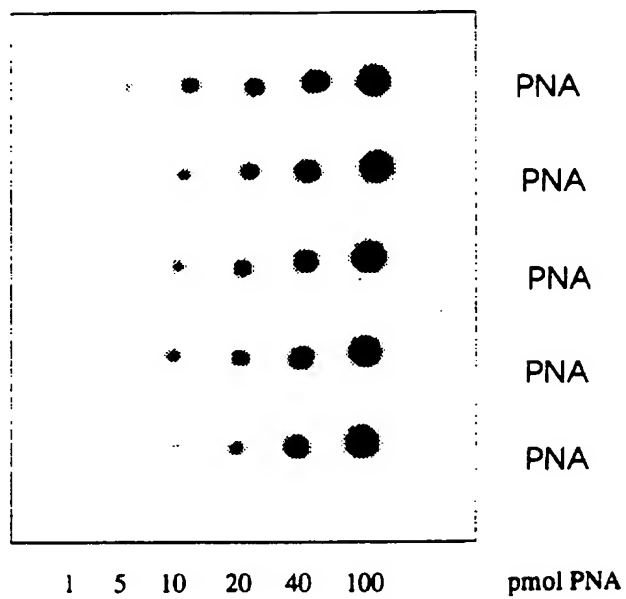
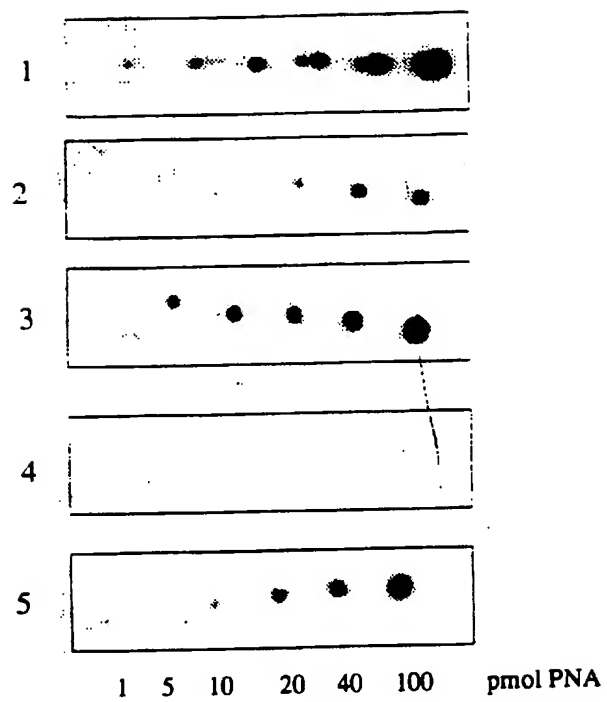
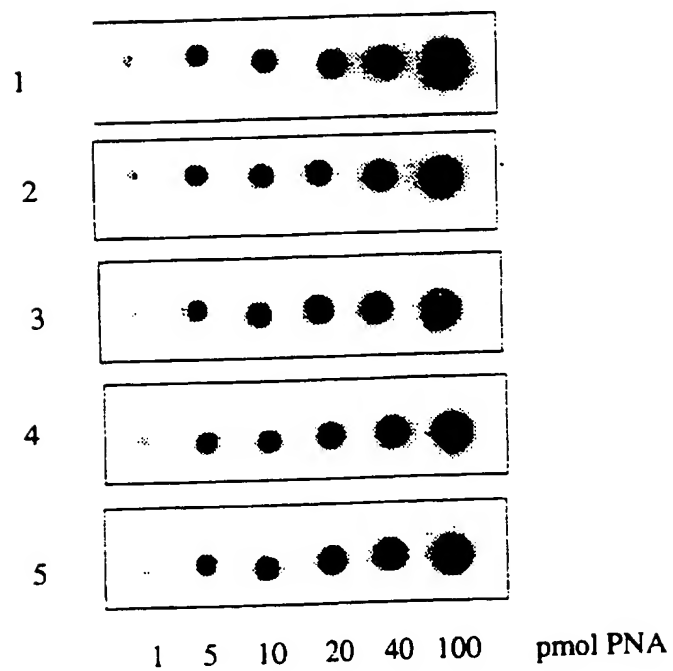


Abb. 4

FIG 5



**FIG 6 A**

**FIG 6 B****FIG 6 C**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 96/00893

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68 //C07H21/00, C07K7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages          | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | WO,A,95 01370 (ISIS PHARMACEUTICALS INC.)<br>12 January 1995<br>see page 1 - page 66<br>--- | 1-13                  |
| A          | WO,A,93 25706 (BUCHARDT ) 23 December 1993<br>see the whole document<br>---                 | 1-13                  |
| A          | WO,A,89 11548 (CETUS CORP) 30 November<br>1989<br>see the whole document<br>---             | 1-13                  |
| A          | WO,A,89 10977 (ISSIS INNOVATION LTD) 16<br>November 1989<br>see the whole document<br>---   | 1-13                  |
| A          | WO,A,89 11545 (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH<br>LTD) 30 November 1989<br>see page 5<br>---    | 1-13                  |
| -/--       |   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June 1996

Date of mailing of the international search report

27.06.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/00893

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br/> vol. 22, no. 24, 11 December 1994,<br/> pages 5456-65, XP002006248<br/> GUO Z ET AL: "direct fluorescence<br/> analysis of genetic polymorphisms by<br/> hybridization with oligonucleotide arrays<br/> on glass supports"<br/> cited in the application<br/> see the whole document<br/> -----</p> | 1-13                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter:   nal Application No

PC:/EP 96/00893

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9501370                              | 12-01-95            | NONE                       |                     |
| WO-A-9325706                              | 23-12-93            | AU-B- 4323593              | 04-01-94            |
|   |                     | CA-A- 2136831              | 23-12-93            |
|   |                     | CZ-A- 9402951              | 13-09-95            |
|   |                     | EP-A- 0646181              | 05-04-95            |
|   |                     | FI-A- 945725               | 05-12-94            |
|   |                     | HU-A- 71931                | 28-02-96            |
|   |                     | JP-T- 8501681              | 27-02-96            |
|   |                     | NO-A- 944655               | 03-02-95            |
|   |                     | SK-A- 149394               | 10-01-96            |
| WO-A-8911548                              | 30-11-89            | AU-B- 632494               | 07-01-93            |
|   |                     | AU-B- 3754289              | 12-12-89            |
|   |                     | EP-A- 0451141              | 16-10-91            |
|   |                     | JP-T- 3504328              | 26-09-91            |
| WO-A-8910977                              | 16-11-89            | AT-T- 110790               | 15-09-94            |
|   |                     | DE-D- 68917879             | 06-10-94            |
|   |                     | DE-T- 68917879             | 05-01-95            |
|   |                     | EP-A- 0373203              | 20-06-90            |
|   |                     | JP-T- 3505157              | 14-11-91            |
| WO-A-8911545                              | 30-11-89            | AU-B- 619308               | 23-01-92            |
|   |                     | AU-B- 3695789              | 12-12-89            |
|   |                     | EP-A- 0418277              | 27-03-91            |
|   |                     | GB-A- 2235531              | 06-03-91            |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00893

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12Q1/68 //C07H21/00, C07K7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A          | WO,A,95 01370 (ISIS PHARMACEUTICALS INC.)<br>12.Januar 1995<br>siehe Seite 1 - Seite 66<br>---     | 1-13               |
| A          | WO,A,93 25706 (BUCHARDT) 23.Dezember 1993<br>siehe das ganze Dokument<br>---                       | 1-13               |
| A          | WO,A,89 11548 (CETUS CORP) 30.November 1989<br>siehe das ganze Dokument<br>---                     | 1-13               |
| A          | WO,A,89 10977 (ISSIS INNOVATION LTD)<br>16.November 1989<br>siehe das ganze Dokument<br>---        | 1-13               |
| A          | WO,A,89 11545 (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH LTD) 30.November 1989<br>siehe Seite 5<br>---           | 1-13               |
|            | -/-  |                    |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20.Juni 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27.06.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00893

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| A         | <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br/>           Bd. 22, Nr. 24, 11.Dezember 1994,<br/>           Seiten 5456-65, XP002006248<br/>           GUO Z ET AL: "direct fluorescence<br/>           analysis of genetic polymorphisms by<br/>           hybridization with oligonucleotide arrays<br/>           on glass supports"<br/>           in der Anmeldung erwähnt<br/>           siehe das ganze Dokument<br/>           -----</p> | 1-13               |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP. 96/00893

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentedokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO-A-9501370  | 12-01-95                      | KEINE                             |                               |
| WO-A-9325706  | 23-12-93                      | AU-B- 4323593                     | 04-01-94                      |
|   |                               | CA-A- 2136831                     | 23-12-93                      |
|   |                               | CZ-A- 9402951                     | 13-09-95                      |
|   |                               | EP-A- 0646181                     | 05-04-95                      |
|   |                               | FI-A- 945725                      | 05-12-94                      |
|   |                               | HU-A- 71931                       | 28-02-96                      |
|   |                               | JP-T- 8501681                     | 27-02-96                      |
|   |                               | NO-A- 944655                      | 03-02-95                      |
|   |                               | SK-A- 149394                      | 10-01-96                      |
| WO-A-8911548  | 30-11-89                      | AU-B- 632494                      | 07-01-93                      |
|   |                               | AU-B- 3754289                     | 12-12-89                      |
|   |                               | EP-A- 0451141                     | 16-10-91                      |
|   |                               | JP-T- 3504328                     | 26-09-91                      |
| WO-A-8910977  | 16-11-89                      | AT-T- 110790                      | 15-09-94                      |
|   |                               | DE-D- 68917879                    | 06-10-94                      |
|   |                               | DE-T- 68917879                    | 05-01-95                      |
|   |                               | EP-A- 0373203                     | 20-06-90                      |
|   |                               | JP-T- 3505157                     | 14-11-91                      |
| WO-A-8911545  | 30-11-89                      | AU-B- 619308                      | 23-01-92                      |
|   |                               | AU-B- 3695789                     | 12-12-89                      |
|   |                               | EP-A- 0418277                     | 27-03-91                      |
|   |                               | GB-A- 2235531                     | 06-03-91                      |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**